

424-199

AU 125 48205

514-78

JA 0082311

MAY 1982

53655 E/26 TANABE SEIYAKU KK 11.11.80-JP-159207 (22.05.82) A61k-09/10 Liposome compsn. prodn. - by dispersing phospholipid in aq medium, freeze-drying and re-dissolving the prod. in aq. medium contg. a drug	B07 (B04) TANA 11.11.80 *J57082-311	B(4-B1B, 5-B1P) 2	1 3
Liposome prepsns. are produced by (a) dispersing phospholipid in an aq. medium, (b) freeze-drying the dispersion, and (c) re-dissolving the resultant freeze-dried product in an aqueous medium containing a drug.		lecithin etc. The aq. medium is preferably water, saline, buffer (phosphate, citrate etc.), aq. saccharides (glucose, sorbitol etc.). The drug may be normal drugs such as diltiazem, glutathione etc., <u>vitamins</u> , enzymes, hormones, antibiotics etc. For preparing a dispersion, 0.01-0.3 wt. pts. of phospholipid is used per pt. of the aqueous medium. The freeze-drying conditions are conventional. Generally, 5-100 wt. pts. of phospholipid is used per pt. of the drug.	
<u>ADVANTAGES/USES</u> Liposome is a good carrier for bringing a drug to the intended tissue, or adjusting the absorption of a drug. Conventional methods for incorporating drugs into liposome involve use of organic solvents (e.g. chloroform, ether, t-butanol) and hence there is a risk that the products still contain residual solvents. The process eliminates such a risk. Uses are pharmaceutical preparations, e.g. oral, injectable, suppository forms etc.		<u>EXAMPLE</u> 25g of yolk phospholipid was dispersed in 20 ml. of a buffer (1/15 M phosphate HCl buffer (pH 7) : 0.9% saline = 1:1) then adjusted to 25 ml. The crude dispersion was treated <u>on an ultrasonic</u> emulsifier, and put in 1 ml. vials. 100 mg. of mannitol was added to each vial and the mixt. was freeze-dried at -40 to -43°C and 0.03-0.9 Torr (16 hrs.) to obtain a freeze-dried product (A). 1 ml. of a cyanocobalamin solution (prepared by dissolving 125 mg cyanocobalamin in 25 ml. of the same saline-buffer as above) and 1 ml. of distilled water were added to (A) to obtain a liposome dispersion contg. cyanocobalamin (20.3%). (4ppW119)	
<u>DETAILS</u> The phospholipid is e.g. phosphatidyl choline, phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl inositol etc.; ovollecithin, soybean lecithin etc., synthetic cpds. such as dipalmitoyl			J570823

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭57-82311

⑬ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和57年(1982)5月22日

A 61 K 9/10

7057-4 C

発明の数 1

審査請求 未請求

(全4頁)

⑮ リポソーム製剤の製法

高槻市古曽部町2丁目15番1-414号

⑯ 特 願 昭55-159207

⑰ 発 明 者 大沢孝

⑱ 出 願 昭55(1980)11月11日

豊中市旭丘4番108-605号

⑲ 発 明 者 原田清

⑳ 出 願 人 田辺製薬株式会社

京都市山科区音羽伊勢宿町33番

大阪市東区道修町3丁目21番地

地の33

㉑ 代 理 人 弁理士 中嶋正二

㉒ 発 明 者 三浦博

明 細 書

発明の名称

リポソーム製剤の製法

特許請求の範囲

リン脂質を水性媒体中に分散させた後、該分散液を凍結乾燥し、かくして得られた凍結乾燥品を薬剤含有水性媒体中に再分散させることを特徴とするリポソーム製剤の製法。

発明の詳細な説明

本発明はリポソーム製剤の製法に関する。

リポソーム (liposome) の構造には、リン脂質二分子膜が水相を隔てて何層にも重なった多重層リポソームと、水相を単一のリン脂質二分子膜によって取り囲んだ単一膜リポソームとがあり (油化学, 26巻, 597頁 (1977年)), 近年、薬剤を目的組織まで直接到達させるための担体として或いは薬剤の吸収を調整するための担体としてかかるリポソームが注目されるに至っている。

リポソーム中に薬剤を取り込ませる方法として

は、例えば (1) リン脂質をクロロホルムに溶解させた後、クロロホルムを除去してリン脂質の薄膜を形成させ、これに薬剤の水溶液を加えて攪拌する方法 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 13巻, 238頁 (1965)], (2) 薬剤を溶解させた水溶液中にリン脂質のエーテル溶液を注入する方法 [ビオシムカ・エ・ビオフィジカ・アクタ, 443巻, 629頁 (1976)], (3) リン脂質及び薬剤をn-ブタノール、n-ブタノール、ジオキサン、酢酸などの有機溶媒に溶解し、これを凍結乾燥した後、凍結乾燥品を水に分散させる方法 (特開昭53-142514号) などが知られている。しかしながら、これら公知方法はいずれも有機溶媒を使用するものであるため、得られたリポソーム製剤中に有機溶媒が残留する虞があるなどの欠点があった。

上記に対し、本発明者らは種々研究を重ねた結果、新規なリポソーム製剤を調製する方法を見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明によれば、薬剤のリポソーム

製剤はリン脂質を水性媒体中に分散させた後、該分散液を凍結乾燥し、かくして得られた凍結乾燥品を薬剤含有水性媒体中に再分散させることにより製することが出来る。

本発明において使用されるリン脂質としては、例えばフォスファチジルコリン、フォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルセリン、フォスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン等の卵黄、大豆その他の動物組織に由来するもの、またはこれらの混合物である卵黄リン脂質または大豆リン脂質、或いはジパルミトイルレシチン等の合成により得られるものが好適に挙げられる。また、上記リン脂質を分散させる水性媒体及び凍結乾燥品を分散させる水性媒体としては、例えば水、食塩水、緩衝液（例えば、リン酸塩緩衝液、トリスアミノメタン緩衝液）、糖類（例えば、ブドウ糖、ソルビトール）の水溶液又はそれらの混合溶液が好適に挙げられる。さらに本発明において使用される薬剤としては、例えばジルチアゼム、グルタチオンなどの一般薬剤の他に例え

ばシアノコバラミンの如きビタミン類；L-アスパラギナーゼ、ウロキナーゼの如き酵素剤；インシュリンの如きホルモン剤；アミノベンジルペニシリン、 α -カルボキシベンジルペニシリンの如き抗生物質；フルオロウラシル、アラシチジンの如き制癌剤などが挙げられる。

本発明方法を実施するに際し、リン脂質の分散液は、例えばリン脂質と水性媒体との混合物をホモジナイザーや乳化機等の通常乳化に使用される装置を用いて分散させることにより調製できるが、より微細な分散液を調製するには、例えば高圧乳化機（マントングウリン乳化機）や超音波乳化機を用いて分散させるのが好ましい。この場合水性媒体とリン脂質との使用割合は水性媒体1重量部に対してリン脂質0.01~0.3重量部程度であるのが適当である。尚、リン脂質分散液中にはリン脂質膜の強化、酸化防止、電荷付与等のため、例えばコレステロール、 α -トコフェロール、ジセチルフォスフェート、ステアリルアミン等をリン脂質1重量部に対して0.1重量部程度加えてお

てもよい。また、凍結乾燥工程において良好な凍結乾燥ケーキを形成させるために、例えばマンニトール、グリシン等の通常用いられる賦形剤をリン脂質1重量部に対して1重量部程度加えておいてもよい。

このようにして調製されたリン脂質分散液を凍結乾燥するにあたっては通常の条件でよく、例えば凍結温度 -20°C ~- 50°C で凍結させ0.1 Torr以下の減圧下に水を昇華させるのが好ましい。

かくして得られる凍結乾燥品を薬剤含有水性媒体中に再分散させるには、薬剤を溶解させた水性媒体を凍結乾燥品に加え振とうすることにより容易に実施することができる。この場合、薬剤と凍結乾燥品中のリン脂質との使用割合は薬剤の種類によっても異なるが概ね薬剤1重量部に対してリン脂質5~100重量部程度が好ましい。また、水性媒体の使用量は凍結乾燥品に含まれるリン脂質1重量部に対して3~100重量部程度が適当であるが、とりわけ凍結乾燥で昇華した量に相当する量程度が好適である。尚、薬剤含有水性媒

体中にはpH調整剤（例えば、塩酸、水酸化ナトリウム）、緩衝剤（例えば、リン酸1ナトリウム、リン酸2ナトリウム）或いは浸透圧調整のための塩（例えば、塩化ナトリウム）や糖類（例えば、ブドウ糖、ソルビトール）を加えておいてもよい。

かくして、薬剤を取り込んだリポソームの分散液が得られる。このリポソーム分散液はこのまま使用してもよいが、例えば遠心分離、限外ろ過或いはゲルろ過などによりリポソームに取り込まれなかった薬剤を分離除去したのち、注射剤、経口剤、坐剤などの剤型にすることもできる。

上記の如き本発明方法によれば、生成したリポソーム中に有機溶媒が残留する虞がないので、本発明方法は薬剤を取り込んだリポソーム製剤の製法として極めて優れたものである。

実施例1

(1) 卵黄リン脂質25gを食塩・緩衝液溶液〔1/15 Mリン酸塩緩衝液（pH7）：0.9%食塩水=1:1〕20ml中に加え、ウルトラ・タラックス（Janke, U. Kunzel KG製の商品名、Type TP

特開昭57-82311(2)

(4) 11898

- 7 -

ラミンの如きビタミン類；L-アミノ酸の如き酵素剤；インホルモン剤；アミノベンジルベンジルシベンジルベンジルの如きホルモンの如き、アラシチジンの如き挙げられる。

実施するに際し、リン脂質の分散液と水性媒体との混合物をホモ化機等の通常乳化するに使用されることにより調製できるが、調製するには、例えば高圧乳ウリン乳（化機）や超音波乳（化機）の如き使用割合は水性媒体1重量部0.1～0.3重量部程度である、リン脂質分散液中にはリン防止、電荷付与等のため、例α-トコフェロール、ジセステアールアミン等をリン0.1重量部程度加えてお

- 6 -

例えば、塩酸、水酸化ナトリウム、リン酸1ナトリウム、あるいは浸透圧調整のための（ウム）や糖類（例えば、）を加えておいてもよい。だんだりボソームの分散ノーム分散液はこのまま遠心分離、限外ろ過成ボソームに取り込まれたのち、注射剤、経口こともできる。

れば、生成したリボソーム製剤の製ある。

塩・緩衝液溶液〔0.9%食塩水、ウルトラ・タラックス名、Type TP

18-10)で粗分散させ、全量を上記緩衝液溶液で2.5mlとする。この粗分散液を超音波乳化機(Ultra sonics Ltd製、Model A350G)で処理して卵黄リン脂質分散液とする。この分散液を1mlづつバイアルに分注し、該分散液にマンニトール100mgを加えて溶解させた後、凍結乾燥機を用い凍結温度-40℃～-43℃、0.03～0.09 Torrの減圧下で凍結乾燥する(乾燥時間:16時間)。かくして凍結乾燥品を得る。

(2) シアノコバラミン125mgを食塩・緩衝液溶液〔1/15Mリン酸塩緩衝液(pH7):0.9%食塩水=1:1〕2.5mlに溶解し、該シアノコバラミン溶液1ml及び蒸留水1mlを上記(1)で得られた凍結乾燥品に加え振とうして分散させる。かくしてシアノコバラミンを取り込んだリボソームの分散液が得られる。

(3) 上記(2)で得られたリボソーム分散液0.5mlをセファデックスG50を用いてゲルろ過(カラム:1.5cm×30cm、溶出溶媒:上記食塩・緩衝液溶液)し、4mlづつ分画する。各分画中のシア

- 9 -

マンニトール100gを溶解後全量を上記と同じ緩衝液で1ℓとする。この粗分散液を高圧乳化機(Gaulin Corporation製、Model 15M)を用い、450kg/cm²の圧力下で分散処理する。この分散液を温時孔径0.45μmのメンブランフィルターでろ過する。かくして得られる卵黄リン脂質分散液を1mlづつバイアルに分注し、凍結乾燥機を用い、凍結温度-40℃～-45℃、0.03～0.09 Torrの減圧下で凍結乾燥する(乾燥時間:16時間)。かくして凍結乾燥品を得る。

(4) L-アスパラギナーゼを0.05M-トリスマミノメタン-塩酸緩衝液(pH8.0)に溶解後、孔径0.45μmメンブランフィルターでろ過してL-アスパラギナーゼ溶液(L-アスパラギナーゼ含有量:2000IU/ml)を調製する。このL-アスパラギナーゼ溶液1mlに上記(1)で得られた凍結乾燥品(卵黄リン脂質分散液1mlより調製したもの)を加え、振とうして分散させる。かくしてL-アスパラギナーゼを取込んだリボソームの分散液が得られる。

特開昭57-82311(3)

ノコバラミン濃度を550mgの吸光度から求め、下式よりリボソーム中へのシアノコバラミンの取り込み率を算出したところ20.3%であった。

$$\text{取り込み率}(\%) = \frac{\text{取り込まれたシアノコバラミン(a)}}{\text{取り込まれたシアノコバラミン(a) + 取り込まれなかったシアノコバラミン(b)}} \times 100$$

×100

$$\left[\begin{array}{l} \text{(a): 分画3～6中のシアノコバラミン} \\ \text{(b): 分画9～15中のシアノコバラミン} \end{array} \right]$$

実施例2

卵黄リン脂質の代りに大豆リン脂質を用い、実施例1の(1)及び(2)と同様に処理することにより、シアノコバラミンを取り込んだリボソームの分散液が得られる。リボソーム中へのシアノコバラミンの取り込み率を実施例1の(3)と同様にして算出したところ21.1%であった。

実施例3

(1) 卵黄リン脂質50gを0.05M-トリスマミノメタン-塩酸緩衝液(pH8.0)800mlに加え、ウルトラ・タラックス(Janke U. Kunzel KG製、Type TP 18-10)で粗分散させ、これに

- 10 -

(3) 上記(2)で得られたリボソーム分散液を蒸留水で100倍に希釈して試料とする。該試料のL-アスパラギナーゼ活性をヨランタ・フィッシュマンらの方法〔フェブス・レターズ60, 17(1975)〕に準じて測定し、Free活性とする。一方、上記試料にトリトンX-100を加えてリボソームを破壊したのちL-アスパラギナーゼ活性を測定し、Total活性とする。次いで下式により、リボソーム中へのL-アスパラギナーゼの取り込み率を算出したところ、31.3%であった。

取込み率(%)

$$= \frac{\text{Total 活性} - \text{Free 活性}}{\text{Total 活性}} \times 100$$

実施例4

(1) ウロキナーゼを0.05Mトリスマミノメタン-塩酸緩衝液(pH8.0)に溶解し、孔径0.45μmメンブランフィルターでろ過してウロキナーゼ溶液(ウロキナーゼ含有量:2000IU/ml)を調製する。このウロキナーゼ溶液1mlを実施例3の(1)で得られた凍結乾燥品(卵黄リン脂質分散液

(E) 11858-750000

1. 型より調製したもの)に加え、振とうして分散させる。かくしてウロキナーゼを取り込んだリボソームの分散液が得られる。

(2) 上記(1)で得られた分散液を蒸留水で希釈して試料とする。該試料のウロキナーゼ活性を森田らの方法〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー、82巻、149-5頁(1977)〕に準じて測定し、*Free* 活性とする。一方、上記試料にトリトンX-100を加えてリボソームを破壊した後、ウロキナーゼ活性を測定し、*Total* 活性とする。次いで実施例3の(9)に示した式に従って、リボソーム中へのウロキナーゼの取り込み率を算出したところ、2.4%であった。

代理人 弁理士 中 嶋 正

